Aus der Klinik und Klinik für Zahn-,
Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Düsseldorf
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. F. Schübel

Die Osteonenausmessung — ein neues Verfahren zur Auswertung von Knochenpräparaten in der Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation
zur Erlangung eines Doktor der Zahnmedizin
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Peter Gehlhar

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0079

Aus der Klinik und Klinik für Zahn-,
Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Düsseldorf
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. F. Schübel

Die Osteonenausmessung — ein neues Verfahren zur Auswertung von Knochenpräparaten in der Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation
zur Erlangung eines Doktor der Zahnmedizin
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Peter Gehlhar

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Krüskemper

Referent
gez.: Priv. Doz.
Dr. Dr. Spiekermann

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Borchard

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

1. Problemstellung
2. Allgemeiner Teil
2.1. Elektromagnetisches Spektrum
2.1.1. Sichtbares optisches Spektrum
2.1.2. Erweitertes unsichtbares optisches Spektrum
2.2. Fluoreszenz
2.2.1. Eigenfluoreszenz
2.2.2. Sekundäre Fluoreszenz
2.3. Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie
2.4. Fluorochrome und ihre Anwendung
2.4.1. Die Fluorochrome
2.4.2. Die Fluorochromierung
2.4.3. Polychrome Sequenzmarkierung
3. Spezieller Teil
3.1. Problemstellung
3.2. Analysengrundlage
3.3. Fluoreszenzmikroskopie
3.4. Aperative Einrichtung
3.5. Berechnung
3.6. Ergebnisse
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Danksagung
7. Lebenslauf
8. Literaturverzeichnis

1. Problemstellung

In den letzten Jahren hat die Fluorszenzmikroskopie in der Histologie und der Histopathologie des Knochens immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Entscheidenden Einfluß hierauf hatte die Entwicklung der sogenannten polychromen Sequenzmarkierung (RAHN und PERREN 1970, 1971, 1972) bei der lebenden Versuchstieren in zeitlich definierten Abständen verschiedenfarbige Fluorochrome injiziert werden.

Diese Fluorochrome lagern sich während der Mineralisationsphase des Knochens in die Calzium-Eiweiß-Mukopolysaccaridkomplexe des Osteoides (EGER et al 1964) und damit in die Appositionszonen der Osteone unter Bildung von Chelatkomplexen ein.

Es ist somit möglich — bei Betrachtung gewonnener Knochenschliffe unter UV-Licht — an Hand der verschiedenen Farben und der unterschiedlichen Intensität der Fluoreszenz qualitative und quantitative Aussagen über den Knochenanbau zu machen.

Damit die Knochenpräparate der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zugängig gemacht werden können, müssen sie unentkalkt eingebettet werden, da die Fluorochrome mit dem Calzium des Knochens eine Chelatverbindung in dem Augenblick eingehen in dem die Matrix mineralisiert wird. Bei einer Entkalkung des Knochens würde das Calzium herausgelöst und damit ginge der für das Fluorochrom notwendige chemische Bindungspartner verloren.

Wichtig für die Weiterentwicklung der Fluoroszenzmikroskopie waren deshalb Fortschritte, die insbesondere auf dem Gebiet der Kunststoffeinbettung gemacht wurden.

Nach EGER (1964) müssen an eine Kunststoffeinbettungsmasse für unentkalkte Knochenpräparate folgende Anforderungen gestellt werden:

a. Einfache und übersichtliche Handhabung.
b. Lückenloses Eindringen des flüssigen Kunststoffes in alle Hohlräume des einzubettenden Knochenmaterials.
c. Hoher optischer Reinheitsgrad des Polymerisates.
d. Härte, die der des Knochengewebes entspricht.
e. Blasenfreiheit
f. Schonung des Gewebes; insbesondere Vermeidung stärkerer Erwärmung.

In den letzten Jahren wurde von SPURR (1969) und von TETSCH und DÖRDELMANN (1977) ein Kunststoff und eine spezielle Verarbeitungsmethode angegeben, die sich für die fluoreszenzmikroskopischen Auswertung von unentkalkten Knochenpräparaten als sehr geeignet erwies.

Bei dieser Einbettmasse handelt es sich um einen niedrig viskösen und volltransparenten Kunststoff, der — und das ist besonders wichtig — nur eine unwesentliche Eigenfluoreszenz aufweist.

Problematisch war bisher weiterhin die quantitative Auswertung der Versuchsergebnisse d.h. — die exakte Berechnung der Größenzunahme der polychrom markierten Osteone und damit — die exakte Berechnung des Knochenan- bzw. abbaus.
Von NATTER wurde 1975 eine Methode angegeben, bei der die Auswertung über mikroskopische Messungen der Osteonendurchmesser erfolgte.
STUHLER beschrieb 1978 ein Verfahren, bei dem die zu messenden Osteone zunächst mit einem Farbumkehrfilm photographiert wurden. Die gewonnenen Farbdias wurden dann mit einem fest installierten Projektor in definiert einheitlichem Abstand auf gewichtsmäßig genormtes Papier (70g/m²) projeziert.
Die Außenränder der Fluoreszenzringe wurden konturiert, die einzelnen Banden ausgeschnitten und mit einer Mikrowaage gewogen. Aus dem unterschiedlichen Gewicht wurde der prozentuale Knochenzuwachs berechnet.
Die Firma LEITZ entwickelte 1975 das Bildanalysesystem LEITZ A.S.M. (Analyse System Manuell). Dieses Gerät war und ist dafür vorgesehen, dem experimentell arbeitenden Wissenschaftler (Anatom - Cytologe - Werkstoffkundler - Chemiker) ein Hilfsmittel in die Hand zu geben, um Bilder eines mikroskopisch oder makroskopisch abgebildeten Objektes quantitativ auszuwerten.

Da es mit dem A.S.M. unter anderem möglich ist Flächenberechnungen durchzuführen, wurde es von uns im Rahmen dieser Arbeit erstmalig dazu benutzt, kunststoffeingebettete Knochenpräparate von polychrom markierten Osteonen in ihrem Flächenzuwachs zu berechnen.

Die vorliegende Arbeit hat die Aufgabe, in ihrem ersten Teil die chemisch physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz, der Fluoreszenzmikroskopie und der polychromen Sequenzmarkierung nach dem heutigen Wissensstand darzustellen.

Im zweiten Teil wird die von uns entwickelte neue Auswertungshilfe zur Osteonenausmessung von Knochenpräparaten in der Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt.

Als Unterlage für diese Berechnungen dienten Knochenpräparate, die 1978 von SPIEKERMANN in einem Tierversuch mit Beaglen im Rahmen eines Forschungsvorhabens in der Dentalimplantologie gewonnen wurden.

In diesem Versuch sollte wissenschaftlich abgeklärt werden, ob durch eine Stimulierung der Osteogenese mit niederfrequenten Wechselströmen (Verfahren KRAUSS-LECHNER) die Einheilung enossaler Implantate beschleunigt werden kann.

2. Allgemeiner Teil

Zum Verständnis seien einige grundsätzliche physikalische Betrachtungen und Zusammenhänge vorangestellt.

2.1 Elektromagnetisches Spektrum

Den gesamten Bereich aller elektromagnetischen Wellen bezeichnet man als elektromagnetisches Spektrum. Es erstreckt sich vom Wechselstrom (Wellenlänge 10^{7}m) bis zur sekundären Höhenstrahlung, darunter versteht man die Strahlung, die beim Stoß kosmischer Materie auftritt (Wellenlänge von bis zu 10^{-17}m) siehe Abb. 1.
Der optische Bereich dieses Spektrums erstreckt sich von 10^{-2}m bis 10^{-9}m und setzt sich zusammen aus dem sichtbaren optischen Spektrum und dem erweiterten unsichtbaren optischen Spektrum.

2.1.1. Sichtbares optisches Spektrum

Weißes Licht wird beim Durchgang durch ein Prisma in Spektralfarben zerlegt (Abb. 2).
Es entsteht ein kontinuierliches Spektrum bestehend aus den einzelnen Spektralfarben rot, orange, gelb, grün, blau und violett. Jede Spektralfarbe besitzt eine unterschiedliche Wellenlänge, wobei rot mit der größten Wellenlänge am geringsten gebrochen wird.

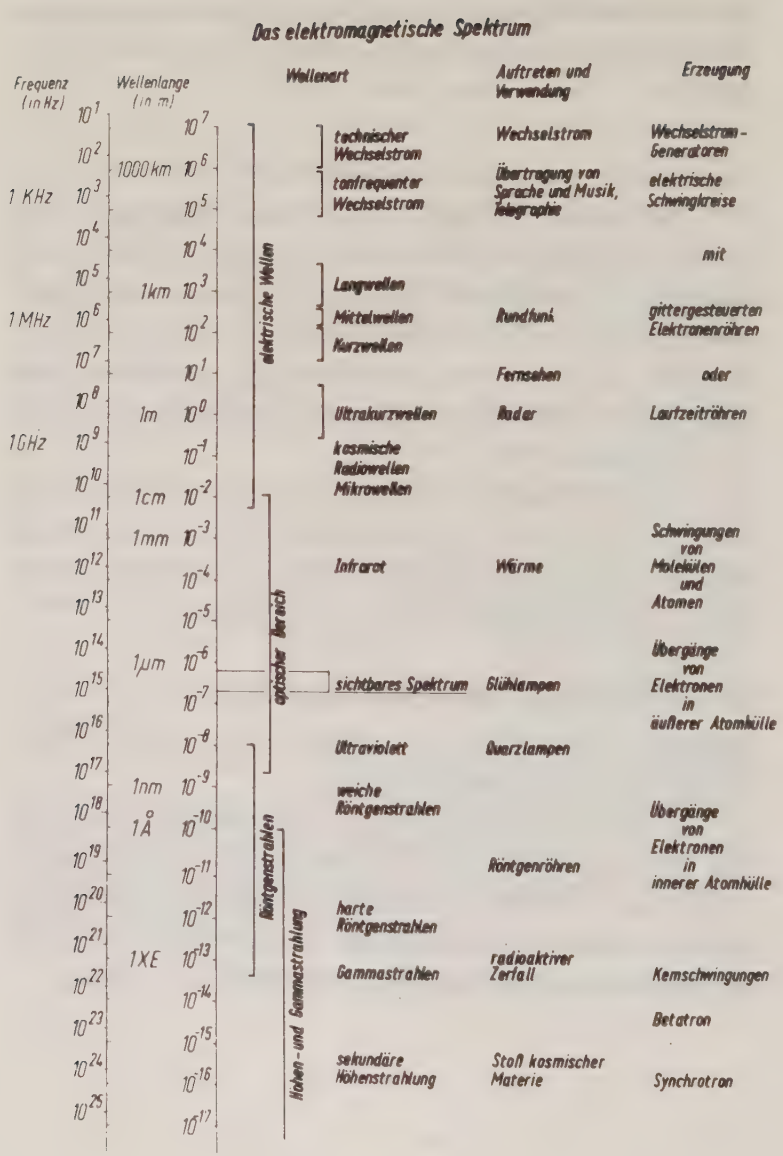


Abb. 1: Das elektromagnetische Spektrum

Jeder leuchtende Körper sendet ein für ihn charakteristisches Spektrum aus. Glühende feste und flüssige Körper zeigen ein kontinuierliches Spektrum. Einatomige Gase (Atome und Atomionen der Edelgase und Metalldämpfe) senden ein Linienspektrum. Mehratomige Gase besitzen ein linienreiches Bandenspektrum.

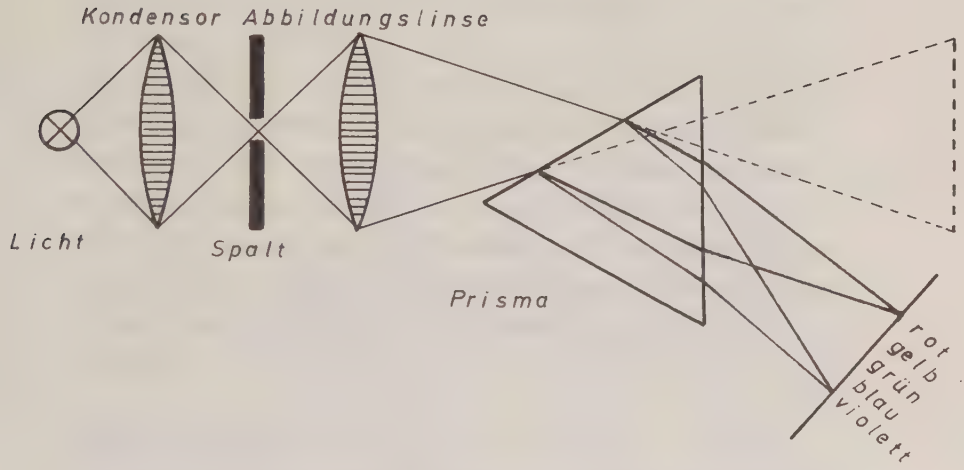


Abb. 2: Weißes Licht wird beim Durchgang durch ein Prisma in Spektralfarben zerlegt

Spektral-farbe	Wellenlänge in nm 3 10^{-9}m	Frequenz (in 10^4 Hz)
Violett	380 - 430	7,9 7,0
Blau	430 - 490	7,0 6,1
Grün	490 - 575	6,1 5,2
Gelb	575 - 585	5,2 5,2
Orange	585 - 650	5,1 4,6
Rot	650 - 750	4,6 4,0

Tab. 1: Jede Spektralfarbe ist physikalisch durch einen Wellenlängen- oder (nach $C = \lambda \cdot \nu$) Frequenzbereich gekennzeichnet.

Die Begrenzung des sichtbaren Spektrums ist nur bedingt durch den physiologischen Bau unseres Auges und nicht durch die physikalischen Eigenschaften des ausgesandten Lichtes.

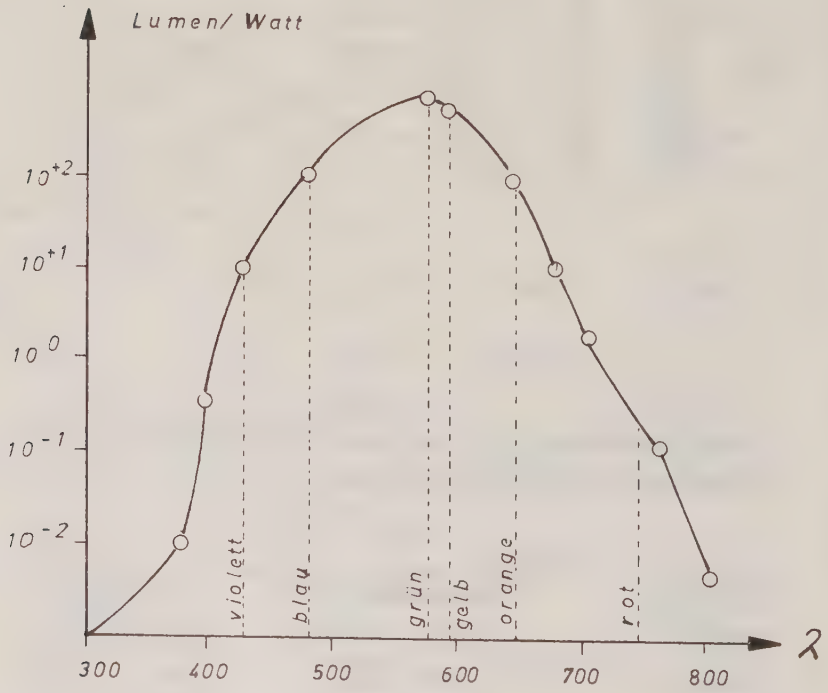


Abb. 3: Empfindlichkeit des menschlichen Auges in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. Das Maximum liegt im Grünen.

2.1.2. Erweitertes unsichtbares optisches Spektrum

Zum erweiterten unsichtbaren Spektrum gehört das ''Ultraviolett'' und das Ultra- (Infra) rot.
Die infraroten Wellen reichen von $3 - 10^{10}$ HZ bis zu $4 - 10^{14}$ Hz und damit von Wellenlängen über ein cm Länge bis zum roten Teil des sichtbaren Spektrums ($650 - 750 \cdot 10^{-9}$m).
Die ultraviolette Strahlung umfaßt Frequenzen von 8,2 -10^{14} Hz bis etwa 10^{17} Hz (Wellenlängen von etwa 3.10^{-7} bis 3.10^{-9}m).
Das ultraviolette Licht wird zum Beispiel mit einer Quecksilberdampflampe erzeugt undf tritt durch ultraviolett durchlässige Quarze oder Uviolglasscheiben ins Freie. Das Ultraviolett erzeugt chemische Reaktionen (z.B. Belichtung von Photoplatten, Bildung von Vitamin D aus Egosterin, Pigmenterzeugung in der Hautoberfläche, Abtötung von Bakterien) und bewirkt Fluoreszenz.

2.2 Fluoreszenz

Grundsätzlich wird unter Fluoreszenz das Leuchten eines Körpers (gasförmig, fest oder flüssig) verstanden, das durch Licht-, Röntgen oder Elektronenstrahlen hervorgerufen wird.

2.2.1. Eigenfluoreszenz

Viele pflanzliche und tierische Stoffe haben die Eigenschaft, durch Beleuchtung mit sichtbarem kurzwelli-

gen Licht, besser mit ultravioletten Licht oder Röntgen- bzw. Kathodenstrahlen selbstleuchtend zu werden oder wie man zu sagen pflegt, zu fluoreszieren. Sie leuchten dann in charakteristischen oft sehr glänzenden Farben, die gewöhnlich von jenen, in denen sie im sichtbaren Licht erscheinen, verschieden sind. Um Fluoreszenzerscheinungen zu beobachten, ist es also notwendig, das zu untersuchende Material zum Beispiel mit ultraviolettem Licht zu bestrahlen. Objekte, die fluoreszenzfähige Stoffe enthalten, leuchten dann farbig auf, wobei Farbton und Helligkeit im allgemeinen für den betreffenden Stoff charakteristisch sind. Dieses Aufleuchten bezeichnen wir als ''Eigenfluoreszenz'' oder ''primäre Fluoreszenz''.

2.2.2. Sekundäre Fluoreszenz

Wenn auch viele tierische, hauptsächlich aber pflanzliche Objekte schon infolge ihrer Eigenfluoreszenz farbenprächtige und kontrastreiche Bilder mit elektiven Aufleuchten einzelner Gewebsteile liefern, so kommt doch diese Eigenschaft nicht allen Bestandteilen des tierischen und pflanzlichen Organismus zu. Es gibt auch solche, die überhaupt nicht fluoreszieren, die also mit ultra-violetten Licht schwarz erscheinen, während andere nur in matten Farben aufleuchten und nur wenige oder gar keine Details erkennen lassen.

Um auch solche Präparate der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung zugänglich zu machen, können diese in Analogie zu den gewöhnlichen histologischen Färbungen mit fluoreszierenden Substanzen behandelt werden. Solche fluoreszierenden Substanzen, auch Fluorochrome genannt, werden wie die Farben von einzelnen Gewebteilen selektiv festgehalten, die dann im Fluoreszenzmikroskop in einer Farbe aufleuchten, die durch die gegenseitige Einwirkung des Gewebes und der fluoreszierenden Substanz bedingt ist. Die auf diese Art hervorgerufene Erscheinung wird als sekundäre Fluoreszenz bezeichnet. Die Erregung zur sekundären Fluoreszenz erfolgt durch Behandlung mit Lösung fluoreszierender Stoffe, die sehr verdünnt sind (1:1000 bis 1:5 Mill.) wodurch die Gefahr struktureller Veränderung der Zellen stark herabgemindert wird. Dieser Vorgang unterscheidet sich von der gewöhnlichen Färbung dadurch, daß Konzentration und Einwirkungsdauer so gewählt werden, daß das behandelte Präparat in gewöhnlichem Lichte ungefärbt oder höchstens fadfarbig erscheint. Trotzdem sind die Bilder im Fluoreszenzmikroskop viel leuchtender und kontrastreicher als wir gefärbte Präparate bei der Mikroskopie im weißen Licht zu sehen gewöhnt sind.

2.3. Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskope ermöglichen ''Vergrößerungen, die über das Vergrößerungsvermögen von Lupen hinausgehen''.

Ein Mikroskop besteht im wesentlichen aus 2 Sammellinsen, die in einem Rohr (Tubus) untergebracht sind. Die dem Gegenstand zugewandte Linse heißt Objektiv, die andere Linse wird als Okular bezeichnet. Objektiv und Okular sind meist keine Einzellinsen, sondern bestehen zur Vermeidung von Linsenfehlern aus korrigierten Linsensystemen. Mikroskope erzeugen mit dem Objektiv ein reelles Bild eines Gegenstandes, das durch ein Okular betrachtet werden kann. Die Vergrößerung des Mikroskopes ist das Produkt aus dem Abbildungsmaßstab des Objektives und der Vergrößerung des Okulars.

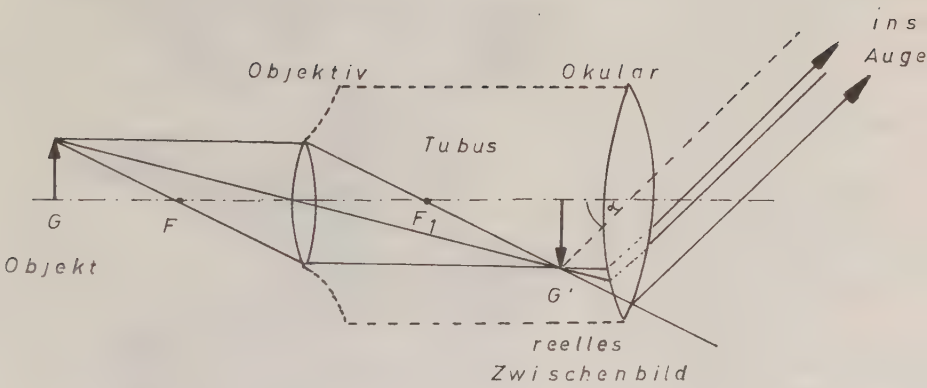


Abb. 4:
Durch ein Mikrospop sieht man ein virtuelles, umgekehrtes Bild des betrachteten Gegenstandes unter vergrößertem Sehwinkel.
Die optisch abbildenden Teile des Mikroskopes, Okular und Objektiv, sind am Tubus befestigt, dieser ist mit einem Objekttisch und Beleuchtungseinrichtung durch das Stativ konstruktiv verbunden. Damit ein Gegenstand in der richtigen Schärfe betrachtet werden kann, werden Tubus und Objekttisch längs der Tubusachse gegeneinander verschoben.
Zur Beleuchtungseinrichtung gehört ein Kondensor (optisches System) mit einer relativ großen Öffnung, der das Licht auf das Objekt sammelt.

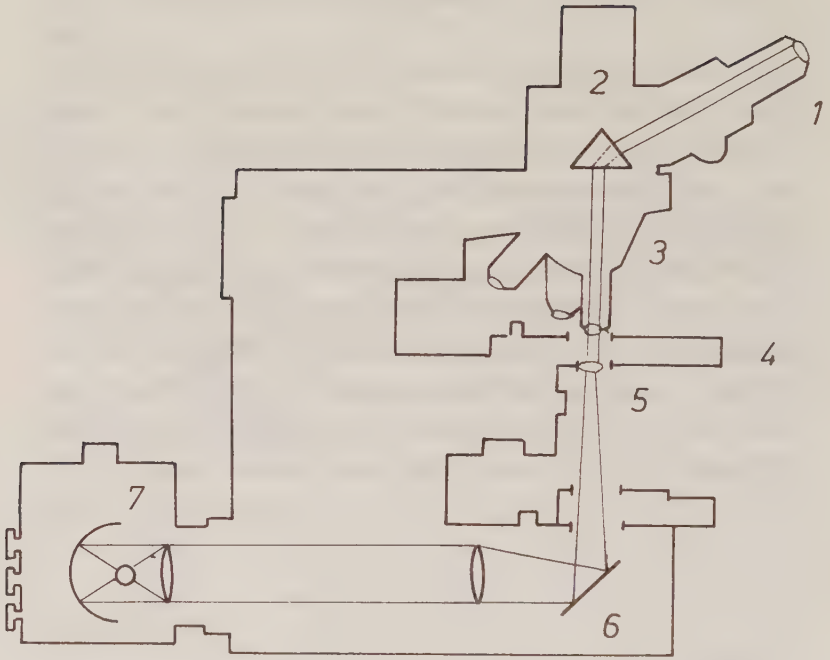
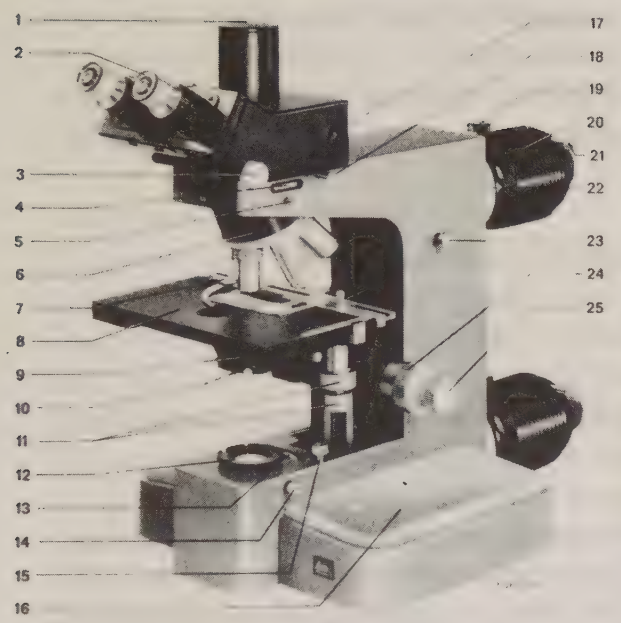


Abb. 5:
Schnitt durch ein Mikroskop mit schematischem Strahlengang

1 Großfeldokular
2 Binokulartubus
3 Objektivrevolver
4 Objekttisch
5 Kondensor
6 Ablenkspiegel
7 Beleuchtungseinrichtung



1 Abnehmbare Kappe im Photostutzen
2 GW/GG-Okulare im Okularstutzen
3 Knopf zum Einstellen des Augenabstandes
4 Filterschieber
5 Klemmschraube zum Arretieren des Objektivrevolvers
6 Objektivrevolver, horizontal wechselbar
7 Objekthalter, Verstellbereich des Präparates 76x52 mm
8 Großer viereckiger Kreuztisch Nr. 660
9 Klappkondensor Nr. 602
10 Hebel der Aperturblende
11 Koaxiale Bedienungsknöpfe für die Kreuzverstellung des Praparats
12 Filterauflage
13 Leuchtfeldblende
14 Arretierung für Zusatzeinrichtungen
15 Umschaltknopf für die Klapplinse
16 Handauflagen aus Kunststoff
17 Hebel zum Ein- und Ausschalten des Strahlenteilers. Hebel ganz herausgezogen Volles Licht in die Okulare. Hebel ganz hineingedrückt: 20% Licht in die Okulare, 80% Licht in den Photostutzen
18 Sperrhebel für die Tubuswechslung
19 Rändelknopf zum Verstellen des Kollektors der Niedervoltleuchte
20 Niedervoltleuchte 12 V 60 W für Auflicht (die Leuchten sind für Auf- und Durchlicht gleich).
21 Schraube zum Festklemmen der Lampenfassung
22 Rändelring zum Befestigen der Niedervoltleuchte
23 Umschaltknopf für die obere Klapplinse (Auflicht)
24 Grobeinstellung
25 Feineinstellung

Abb. 6:
Forschungsmikroskop ''Orthoplan''

In erster Linie benutzt man aber ein Mikroskop weniger wegen seiner hohen Vergrößerung, als wegen des gegenüber dem unbewaffneten Auge höheren ''Auflösungsvermögens''.
Unter ''Auflösungsvermögen'' versteht man den kleinsten Abstand, den zwei Punkte im Objekt haben dürfen, um gerade noch als Schatten erkannt zu werden. Das Auflösungsvermögen d hängt ab von der Wellenlänge λ des Lichtes, von der Brechzahl n des Mediums

im Objektraum des Mikroskopes und von dem ausgenutzten Öffnungswinkel 2 μ des Obkektives.

Nach E. ABBE ergibt sich für das Auflösungsvermögen d folgende Gleichung:

$$d = \frac{2}{2n \sin \mu} = \frac{2}{2\,A}$$

dabei wird „n·sinμ" auch als numerische Apertur A bezeichnet.

Den außerordentlichen verschiedenen Verwendungszwecken und Anforderungen entsprechend wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Mikroskoparten entwickelt.

Die wichtigsten seien hier kurz beschrieben.

Auflichtmikroskop

Undurchsichtige Körper lassen sich nur im reflektierten Licht betrachten. Am elegantesten löst man das Beleuchtungsproblem so, daß der Beleuchtungsstrahlengang durch das Objektiv geführt wird. Durch eine Strahlenteilerplatte werden die Erregerstrahlen zum Objekt hin abgelenkt, dieses konzentriert die Anre-

gungsstrahlung im Objektfeld. Das von dort emitierte Licht wird dann vom Objektiv gesammelt und tritt in umgekehrter Richtung auf die Strahlenteilerplatte, die mehr als 90% des Lichtes durchläßt und für die Abbildung nutzbar macht.

Dunkelfeldmikroskop

Durch einen Eingriff in das Beleuchtungssystem kann man erreichen, daß in das Objektiv kein direktes Licht der Lichtquelle gelangt, sondern nur am Objekt gestreutes Licht. Damit kehren sich die Kontrastverhältnisse im Bild um (Hellfeld: dunkle Gegenstände auf hellem Grund). Dieser Effekt kann eine erhebliche Steigerung der Erkennbarkeit von besonders kleinen Teilchen (z.B. Krankheitserregern) bringen.

Phasenkontrastmikroskop

In einem normalen Lichtmikroskop lassen sich nur Objekte erkennen, die das Licht mehr oder weniger absorbieren als ihre Umgebung (Amplituden-Objekte). Unterscheiden sich die Objekte nur durch ihre Brechzahl von der Umgebung (Phasenkontraste), so müssen die sich daraus ergebenden (normalerweise unsichtbaren) Phasenunterschiede des Lichtes durch Eingriffe in den Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang in Helligkeitsunterschiede verwandelt werden.

Polarisationsmikroskop

In einem Polarisationsmikroskop wird das Objekt mit polarisiertem Licht beleuchtet und durch Polarisationsfilter betrachtet. Dadurch werden Drehungen der Polarisationsebene sichtbar, so daß man Kristallorientierungen bestimmen kann.

Interferenzmikroskop

Es handelt sich hierbei um eine Kombination von Interferometern und Mikroskopen. Interferometer sind Geräte, die man zur Längenmessung benutzt, wobei die Wellenlänge des Lichtes als Maßstab genommen wird. Die physikalische Messung beruht auf dem Vergleich von Längen (genauer gesagt: optischen Weglängen = Länge X Brechzahl des Mediums).
Charakteristisch ist, daß zwei Strahlengänge nebeneinander bestehen, aus deren Interferenzerscheinungen, die den Bildern überlagert sind, Rückschlüsse auf Oberflächenstrukturen, z.B. feine Höhenunterschiede, auf Dicke bzw. Brechzahl kleiner Objekte sowie auf die Trockenmasse lebende Zellen gezogen werden können.

Elektronenmikroskop

Da sich die numerische Apertur nicht mehr wesentlich steigern läßt, (siehe s. 16) muß für einen entscheidenden Fortschritt im Auflösungsvermögen eine Strahlung mit erheblich kürzerer Wellenlänge benutzt werden.

Eine solche Strahlung stellen schnell bewegte Elektronen dar. Sie haben eine rund 100000 mal kleinere Wellenlänge als das sichtbare Licht. Da auch die Objektivapertur um zwei bis drei Zehnerpotenzen kleiner ist als beim Lichtmikroskop, konnte man das Auflösungsvermögen gegenüber dem Lichtmikroskop bis jetzt etwa auf das 500-fache verbessern.

Fluoreszenzmikroskop

Von allen in der Forschung und bei Routineuntersuchungen angewandten lichtmikroskopischen Verfahren hat die Fluoreszenzmikroskopie in den letzten 20 Jahren wohl am meisten an Bedeutung gewonnen. Der Grund dafür ist ihre hervorragende Eignung für qualitative und quantitative Aussagen über chemische und physikalische Eigenschaften von Objekten im Zusammenhang mit deren lichtmikroskopisch aufgelöster Struktur. Ähnlich wie durch Darstellungen im Phasen- oder Interferenzkontrast erfährt die Untersuchung absorbierender Strukturen durch die Fluoreszenzmikroskopie eine sinnvolle Ergänzung.

Das Fluoreszenzmikroskop unterscheidet sich im Grundaufbau **nicht** von einem normalen Lichtmikroskop.

Folgende Einrichtungen sind jedoch für die Fluoreszenzmikroskopie notwendig:

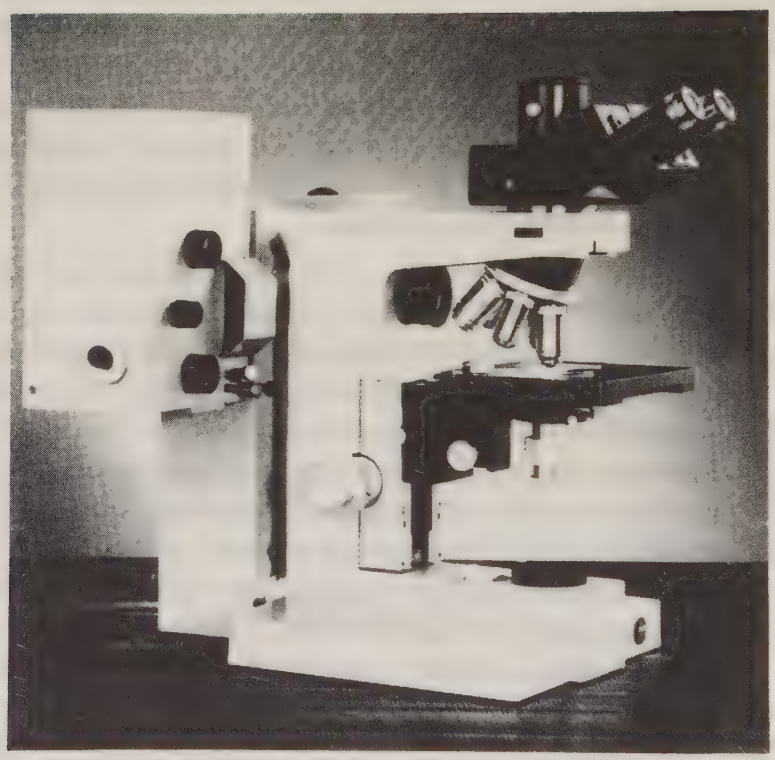


Abb. 7: Forschungsmikroskop ''Orthoplan'' mit Fluoreszenzeinrichtung

a) Lichtquellen mit hoher bis höchster Leuchtdichte im nahen Ultraviolett und im kurzwelligen sichtbaren Spektralbereich für eine ausreichende Anregungsintensität. Neben Gasentladungslampen (XENON-Hochdrucklampe oder Hg-Höchstdrucklampe) ist bei geringen Anforderungen an die Leuchtdichte auch eine Halogen-Glühlampe 12 V/100 W verwendbar.

b) Erregerfilter selektieren aus der von der Lichtquelle kommenden Strahlung allein die für die Anregung der Fluoreszenz benötigten Wellenlängen und lassen sie zum Objekt gelangen (420-460 μm).

c) Die Mikroskop-Optik hat neben ihrer rein abbildenden Funktion, die Aufgabe, die größtmögliche Energiedichte der Erregerschatten in der Objektebene zu erzeugen (Kondensor) und ein Maximum des von dort emittierten Fluoreszenzlichtes zu erfassen (Objektiv). Um Kontrastminderung zu vermeiden, soll die Eigenfluoreszenz der optischen Elemente des Mikroskopes ebenso wie die von Objektträger, Deckglas, Einbettungs- und Immersionsmedium so gering wie möglich sein.

d) Sperrfilter halten vom Präparat gestreutes und in das Objektiv eingetretenes Erregerlicht zurück, während ihre Durchlässigkeit für das Fluoreszenzlicht optimal ist. Auch hier darf keine störende Eigenfluoreszenz des Filtermaterials auftreten.

Den Präparateigenschaften entsprechend lassen sich insbesondere die an die Mikroskopoptik zu stellenden Forderungen in unterschiedlicher Weise erfüllen.

2.4. Fluorochrome und ihre Anwendung

2.4.1. Die Fluorochrome

Aus fluoreszenzanalytischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Lösungen fluoreszierender Substanzen von verschiedenen Stoffen (Cellulose, Wolle, Seide, Knochen) nicht nur mit verschiedener Energie, (bedingt durch die chemische Bindung) sondern höchst selektiv festgehalten werden. Derartige Adsorbate leuchten namentlich an den Grenzflächen besonders lebhaft und fluoreszieren nach dem Trocknen meist viel intensiver als die zu ihrer Herstellung verwendeten Lösungen. Sie zeigen in der Regel noch dann deutlich wahrnehmbare Fluoreszenz, wenn die Lösungen so stark verdünnt sind, daß sie selbst nicht mehr fluoreszieren. Solche Lösungen sind aber meist schon farblos oder nur ganz schwach gefärbt, weshalb auch die Adsorbate im gewöhnlichen Licht ungefärbt oder in ganz zarten Farbtönen erscheinen. Im ultra-violetten Licht dagegen leuchten sie in den lebhaftesten Farben. Dieses Verfahren, also gewissermaßen ein Anfärben mit Farbstoffen, kann auch zur Behandlung tierischer und pflanzlicher Objekte herangezogen werden, indem man diese in Lösungen fluoreszierender Stoffe tränkt. Bei mikroskopischer Betrachtung eines so behandelten Präparates in ultra-violettem Licht erscheint dies dann farblich. Aber nicht alle fluores-

zierenden Stoffe sind hierzu geeignet. Es sind vielmehr nur solche Stoffe als Fluorochrome im Sinne der histologischen Färbung brauchbar, welche von einzelnen Geweben selektiv festgehalten werden, während andere Gewebeteile desselben Präparates ihre Eigenfluoreszenz beibehalten bzw. in einer Farbe erscheinen, die sich durch eine additive Mischung der Farbe, der Eigenfluoreszenz und der Fluoreszenzfarbe des verwendeten Mittels ergibt. Weil fast in jedem Objekt derartige verschiedene Gewebeteile nebeneinander liegen, sieht man unter Verwendung eines einzigen Fluorochromes im mikroskopischen Bilde diese in mehreren Farben aufleuchten. Ein Bild, das im gewöhnlichen Licht nur durch Mehrfachfärbung erreicht werden kann.

2.4.2. Die Fluorochromierung

Ziel der Fluorochromierung ist nach HARMS (1965) die farbliche Hervorhebung einzelner histo-chemisch definierter Strukturelemente (Eiweiße, Fette, Kristalle, Oele usw.) oder morphologisch wichtiger Teile der Zelle und deren Bestandteile. Ein weiteres Ziel ist das leichtere Auffinden von Mikroorganismen in Gewebsschnitten.

Eine Veröffentlichung, die das ganze Problem der sekundären Fluoreszenzmikroskopie bereits zu einem Zeitpunkt vorwegnahm, in dem fast alle Voraussetzungen für ihre praktische Verwirklichung fehlten, war die von S. v. PROWAZEK aus dem Jahre 1918 (zit. nach HARMS, 1965) der dort wie folgt schreibt:

''Unsere nächste Aufgabe bestand darin, in die Zelle Stoffe verschiedener Art, ohne Rücksicht darauf, ob es Farbstoffe oder farblose Pharmake sind, einzubringen, in der Voraussetzung, daß diese, bestimmten Verteilungsgesetzen folgend, sich unter Umständen in gewissen Funktionsträgern der Zelle ansammeln und so im Dunkelfeld der Fluoreszenzmikroskopie die Partialfunktion der Zelle gleichsam illuminieren''.

PROWAZEK war mit den damaligen Hilfsmitteln noch nicht in der Lage, dieses weitschauende Programm auszuschöpfen und hatte als Fluorochrome lediglich Fluorescein, Eosin, Neutralrot und Chinin zur Verfügung.

Erst 19 Jahre später wurde dieses Aufgabengebiet mit wesentlich verbesserten Apparaten durch HAITINGER (1936) und HAMPERL (1936) systematisch erschlossen.

Seitdem ist auch das Auffinden von Bakterien bzw. Sporen, aber auch Viren oder sonstiger vereinzelt vorkommend geformter Elemente zum Gegenstand einer gezielten Fluorochromierung geworden: EXNER (1933, 1934, 1936) und HAITINGER (1937, 1939) beschreiben die Fluorochromierung des Zentralnervensystemes.

1951 befaßt sich E. SINGER mit der Auswertung der Fluorochromierung von Nervensystemen, Tonsillen, Nebennieren und Nieren.

1953 berichten MENKEN und HINSELMANN über die Fluorochromierung der Portio zwecks Verdeutlichung kolposkopischer Befunde.

Über die Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie bei der Untersuchung von Fleisch- und Wurstwaren wird 1953 von MÜNCHBERG berichtet.

FLEGEL beschreibt 1954 die Fluorochromierung pathologischer Hautschnitte (lupus vulgaris, tertäre Syphillis).

Ebenso werden die ersten Fluorochromierungen in der Cytodiagnostik unternommen (FRIEDBERG 1950, 1951).

CANZER (1952) berichtet über eine automatische Registriermethode für fluorochromierte Karzinomzellen in Zellausstrichen und Punktaten, bei der die Stärke des Fluoreszenzlichtes, das die Zellen aussendeten, für die Registrierung ausschlaggebend ist.

Tetracycline

Von großer Bedeutung waren die Arbeiten von MILCH, RALL und TOBI, die 1957 über das Phänomen der Lebendfixation von Tetracyclinen im Knochen berichteten.

Hier war es erstmalig möglich, den zeitlichen und räumlichen Ablauf des Knochenanbaus und des Kochenumbaus mikroskopisch erfassen zu können. Ebenso konnten Aussagen über das Zahnwachstum, die Verkalkung des Knorpels und über die Knochenheilung gemacht werden.

Mit dem Antibioticum ''Tetracycline'' war ein Fluorochrom gefunden worden, das nicht nur einem toten Organismus, sondern auch einem lebenden Organismus zugeführt werden konnte.

Aus der Reihe der Tetracycline gibt es eine große Anzahl von Fluorochromen. Das am meisten gebrauchte ist das Declomycin^{R}.

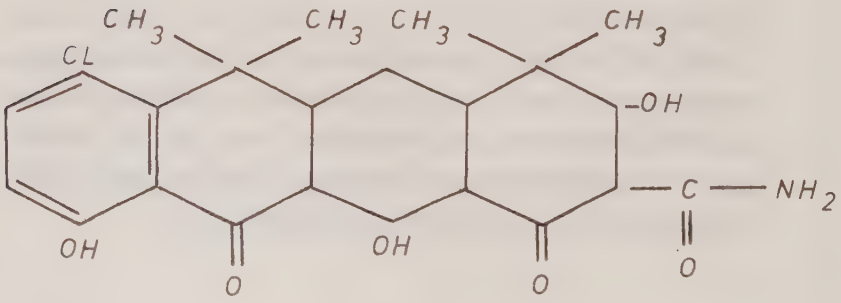


Abb. 8:
Struktur des Tetracyclinemoleküles (Chlortetracyclin)

Die sterische Anordnung der Hydrocyl- und Carbonylgruppen erscheint von großer Wichtigkeit für die Fixation im mineralisierten Knochen (FROST, 1961).
Nach BOOTHE und Mitarbeitern (1953, 1954) besitzt das Tetracyclinmolekül die Fähigkeit, Komplexe oder Chelate mit einer großen Anzahl physiologisch wichtiger Ionen unter ihnen Kalzium, Magnesium, Strontium, Eisen und Kupfer zu bilden.
Bei Anwesenheit von Tetracycline im Blutstrom kommt es zu einer Anlagerung des Tetracyclines in den Skeletteilen, in denen eine neue Knochenmatrix oder hyaliner Knorpel mineralisiert wird. Dabei entspricht das Muster der Tetracycline-Anlagerung dem Muster der Kalziumablagerung und dieses wiederum entspricht dem Muster der Mineralisation.
Durch die Tetracyclineeinlagerung erhält man sowohl in den Haversschen Systemen des kompakten Knochens als auch im spongiösen Knochen markierte Zonen.
Voraussetzung für die Darstellung der markierten Zonen ist, daß das Knochengewebe nicht entkalkt wird, da das Tetracyclin mit Kalzium eine Chelatverbindung in dem Augenblick eingeht, in dem die Matrix mineralisiert wird. Bei einer Entkalkung des Knochengewebes würde das Kalzium herausgelöst und die Markierung beseitigt. Das als Apatit vorliegende Knochenmineral reagiert nicht mit Tetracycline.

Die besten Ergebnisse für eine dauerhafte Markierung mit Tetracycline wurden bei Tieren durch intraperitoneale Gabe von 75 mg pro Kilogramm Körpergewicht erzielt. Für das Studium der Knochenheilung am Menschen erwies sich eine intravenöse Gabe von ebenfalls 75 mg/kg als günstig (FROST 1961).

Alizarin

Im Jahre 1905 wurde erstmalig von LINDVALL das Fluorochrom Alizarin rot S zum Anfärben von Knochengewebe benutzt.

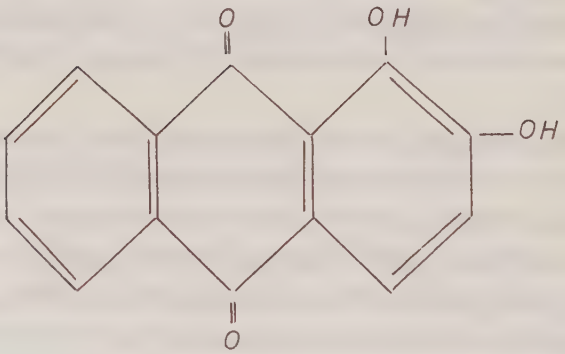


Abb. 9:
Alizarin rot S

Zum Studium des Knochengewebes wurde Alizarin rot S 1965 von HARRIS als zweites intravital zu applizierendes Fluorochrom neben den Tetracycline eingeführt.

ADKINS erkannte 1965 die schädliche Wirkung des Alizarin rot S auf die Knochenbildung. Er forderte deshalb, daß das Alizarin rot S lediglich als zuletzt injiziertes Fluorochrom, also kurz vor dem Abtöten des Versuchstieres genommen werden sollte.

Calcein blau

1970 wurde von RAHN und PERREN mit dem ''Calcein blau'' ein weiterer wichtiger Vertreter der modernen Fluorochrome angegeben.

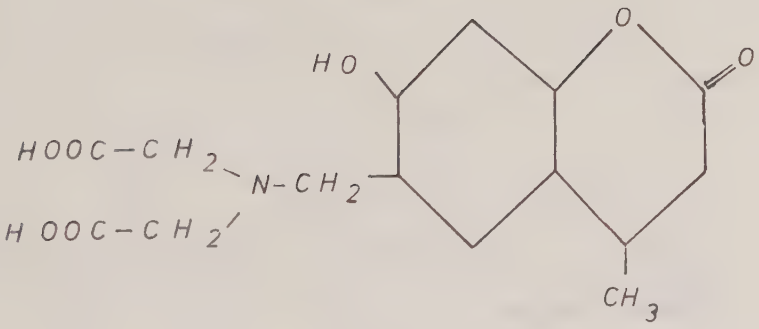


Abb. 10:
Calcein blau

In Dosen von 30 mg/kg Körpergewicht wurde Calcein blau intraderitoneal injiziert. Als Versuchstiere dienten Schafe, Kaninchen und Ratten.

Die Toxizitätstests ergaben, daß es bei Dosen von 30 mg/kg Körpergewicht nicht zu toxischen Erscheinungen kommt.

Xylenol orange

Das Fluorochrom ''Xylenol orange'' wurde ebenfalls von RAHN und PERREN entwickelt und 1971 erstmals vorgestellt.

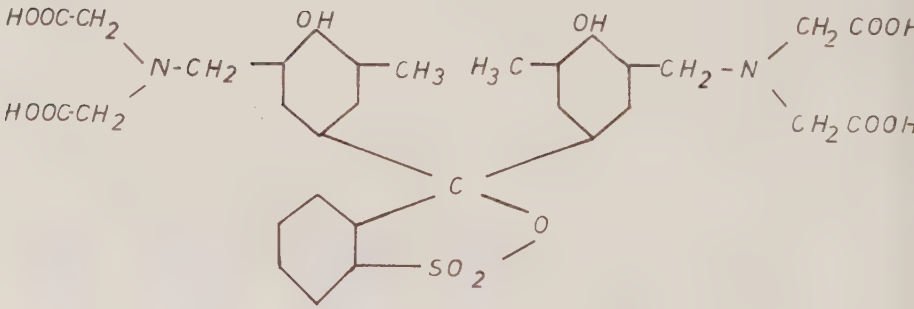


Abb. 11:
Xylenol orange

Xylenol orange produziert ein klar umrissenes Fluoreszenzbild in Knochen und Dentin, uind zwar in Arealen, die im Augenblick der Farbgabe verkalkt sind (siehe S. 27). Die Intensität der Fluoreszenz ist abhängig von der gegebenen Dosis (bis 90 mg pro Kilogramm Körpergewicht).

Die orangene Farbe gibt einen sehr guten Kontrast zu den anderen bekannten Fluorochromen. Intravenöse, subkutane und intraperitoneale Gaben der Farbe mit Dosen von bis zu 90 mg pro Kilogramm Körpergewicht wurden von Ratten, Kaninchen, Schafen und Hunden sehr gut toleriert. Nach schnellen Injektionen kam es zeitweilig zu Hyperventilationen und zu einem muskulären Hypertonus. Außerdem kam es innerhalb von einer halben Stunde nach der Injektion zu einer dunkel purpurnen Anfärbung des Urins.

Alizarinkomplexon

Mit Alizarinkomplexon wurde 1971 ebenfalls von RAHN und PERREN ein neues Fluorochrom vorgestellt, das ebenso wie das Alizarin rot S eine rote Fluoreszenz aufweist.

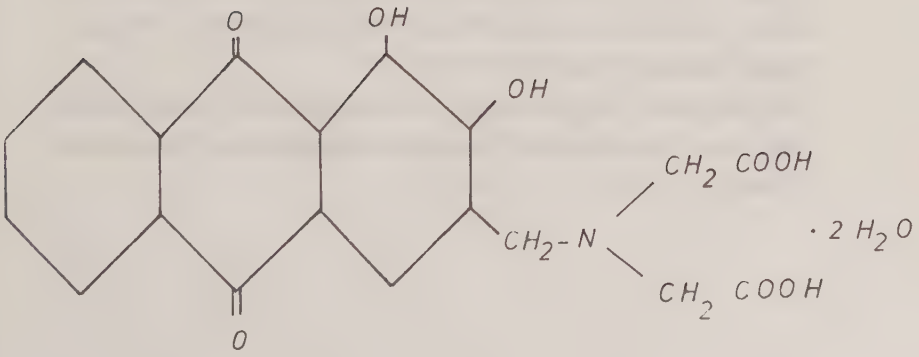


Abb. 12:
Alizarinkomplexon

RAHN und PERREN fanden bei ihren Versuchen mit Kaninchen, Ratten und Mäusen heraus,

a) daß die Fluoreszenz nach intravenöser und intraperionealer Injektion gleich intensiv war, während die perorale Gabe von 30 mg/kg nur eine schwache Intensität hervorrief;
b) daß das Verhältnis zwischen nötiger Dosis und LD 50 beim Alizarinkomplexon günstiger ist als bei den bisher verwendeten roten Fluorochromen Alizarin rot S (HARRIS 1960) und Haematoporphyrin (OLERUD, LORENZI, 1970).

2.4.3. Polychrome Sequenzmarkierung

Nachdem FROST 1960 mit der Einführung des Tetracyclines als Fluorochrom den Grundstein zur Vitalmarkierung an unentkalktem Knochengewebe gelegt hat, wurden die Schwierigkeiten, die bei der Interpretation von Knochenpräparaten, die zum Studium des Knochenan- und Knochenumbaues benötigt wurden, schnell erkannt.

Diese Interpretationsschwierigkeiten entstanden, wenn ein und dasselbe Fluorochrom mehrere Male injiziert wurde (OLERUD 1970).

Die logische Folge dieser Erkenntnis war die Entwicklung der polychromen Sequenzmarkierung (RAHN und PERREN 1970, 1971, 1972).

Bei der Methode der polychromen Sequenzmarkierung werden dem lebenden Tierorganismus (Kaninchen, Ratten, Schafe, Hunde) in zeitlich definierten Abständen (nach ein, zwei, drei vier und fünf Wochen) verschiedenfarbige Fluorochrome peritoneal, subkutan oder intravenös verabreicht, die während der Mineralisation des Knochens in die Calcium-Eiweiß-Mukopolysaccaridkomplexe der Osteoide (vergl. S. 1) eingelagert werden.

Nach Auswertung der unentkalkten Knochenpräparate kann man dann aus den Abständen der Farbmarkierungen untereinander und in etwa auch aus der Intensität der Farben, Rückschlüsse ziehen, wieviel Knochensubstanz pro Woche neugebildet wird (Appositionsgeschwindigkeit) und in welchen Wochen post. op. die Mineralisationsvorgänge am stärksten waren. Diese Methode wurde mit Erfolg von mehreren Autoren (RAHN und PERREN 1970, 1971, 1972, SCHARGUS KOCH, 1975, STUHLER 1978, SPIEKERMANN 1979) benutzt.

Fluorochrom	Farbe	Jahr	Autoren
Tetracycline	gelb	1957	MILCH, RALL, TOBIE
Xylenolorange	orange	1971	RAHN, PERREN
Alizarinrot S	rot	1960	HARRIS
Hametoporphyrin	rot	1970	OLERUD, LORENZI
Calcein	grün	1970	RAHN, PERREN
Calcein blau	blau	1970	RAHN, PERREN
Alizarin komplexon	rot	1971	RAHN, PERREN

Tab. 3

3. Spezieller Teil

3.1. Problemstellung

Es soll eine neue Auswertungshilfe bei der polychromen Sequenzmarkierung vorgestellt werden, mit deren Hilfe es möglich ist, nahezu fehlerfreuie Berechnungen über das Knochenwachstum einzelner Osteone bei unentkalkten Knochenpräparaten vorzunehmen.
Durch sie ist man dann in der Lage, Aussagen über den prozentualen Knochenzuwachs in definierten Zeiträumen zu machen.
1978 hat sich SPIEKERMANN in einem Tierexperiment mit Fragen der Einheilung enossaler Implantate im Kiefer unter Kaufunktion und Elektrostimulation beschäftigt. Dabei kam das von KRAUS (1972) angegebene Verfahren der Stimulation der Osteogenese durch Unterschwellige magnetische und elektrische Wechselpotentiale zur Anwendung.
SPIEKERMANN fand heraus, daß die Bindegewebsbreiten zwischen Tantal- und Titanimplantaten und dem periimplantären Knochen bei den stimulierten Implantaten signifikant schmaler waren als bei den nichtstimulierten. Ebenfalls waren die Lockerungsgrade der stimulierten Implantate signifikant geringer als die nicht stimulierten.
Die Auswertung der Präparate wurde von SPIEKERMANN mit einem Messmikroskop durchgeführt.
Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diese bisher vorhandenen Präparate nach der neuen Methode der Osteonenausmessung nochmals auszuwerten, um zu quantitativen Ergebnissen zu kommen und um SPIEKERMANNS Ergebnisse zu bestätigen.

3.2. Analysengrundlagen

Als Analysengrundlage dienten die histologischen Präparate von zwölf Beaglemandibulae, die 1978 von SPIEKERMANN gewonnen werden konnten.

Zu Beginn des Versuches wurden den Hunden die Unterkieferseitenzähne per Osteotomie entfernt. Nach etwa einem halben Jahr wurden im Bereich der dann zahnlosen Unterkieferhälften enossale Schrauben-und Blattimplantate eingebracht, die mit Hilfe von Kunststoffbrücken kaufunktionell belastet wurden.

Sechs Versuchstiere (Hund 1, 3, 5, 6, 10) wurden zur Stimulation der Osteogenese im Implantatlager über einen Zeitraum von 6 Wochen — 2 Tage post op. beginnend — täglich 6 Stunden lang mit einem von KRAUS und LECHNER angegebenen Verfahren elektromagnetisch behandelt.

Die restlichen Versuchstiere (Hund 2, 7, 8, 9, 11 und 12) wurden als Kontrollgruppe geführt. Von einem rechts- links- Blindversuch bei allen 12 Tieren wurde von SPIEKERMANN Abstand genommen, weil das von der Kieferspule entwickelte Magnetfeld auf die Kontroll- oder Blindseite Einfluß genommen und zu unklaren Ergebnissen geführt hätte.

Zur Darstellung und quantitativen Analyse der Mineralisationsvorgänge nach Eingliederung der Implantate kam die von RAHN und PERREN angegebene polychrome Sequenzmarkierung zur Anwendung. SPIEKERMANN wählte aus der Reihe der fluoreszierenden Substanzen das Tetracyclin Achromycin und die von RAHN und PERREN angegebenen Fluorochrome Calcein blau, Xylenol orange, Cylcein grün und Alizarinkomplexon aus.
In wöchentlichen Abständen — bes. eine Woche post.-op. — wurden die angesetzten Lösungen den Hunden subkutan im Bereich des Nackens und der Bauchdecken injiziert.
Zeitpunkt und Dosierung der einzelnen Fluorochrome gehen aus Tabelle 4 hervor.

1. Woche post.op.	2. Woche post.op.	3. Woche post.op.	4. Woche post.op.	5. Woche post.op.
Calcein blau	Xylenol orange	Calcein grun	Achromycin	Alizarin Komplexon
30 mg/kg	90 mg/kg	20 mg/kg	25 mg/kg	30 mg/kg

Tab. 4

Sechs Wochen post.op. wurden die Tiere durch intravenöse Injektionen von T 61 R (Fa. Hoechst) getötet. Die Unterkiefer wurden intoto excidiert und im Bereich der Implantate wurden Knochensegmente ausgesägt. 24 Präparate wurden für Hartgewebsschnitte vorgesehen und nach der Dehydration des Knochens in der aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 96%-iger Alkohol für jeweils 4 Stunden) einem speziellen Einbettungsverfahren unterzogen. Dieses Verfahren wurde erstmals von SPURR (1969) und in letzter Zeit von TETSCH und DÖRDELMANN (1977) angegeben.

Bei der Einbettmasse handelte es sich um einen niedrig viskösen und voll transparenten Kunststoff mit unwesentlicher Eigenfluoreszenz und folgender Zusammensetzung

Venylolohexendioxyd	(10,09)
Nonenylbernsteinsaureanhydrid	(26,09)
Dimethylaminoäthanol	(0,49)
(Beschleuniger)	

Die Infiltration des Knochens mit dieser Einbettmasse erfolgte über 24 Stunden im Exsikkator, um eine blasenfreie Einbettung zu gewährleisten. Polymerisiert wurde der Kunststoff im Wärmeschrank unter langsamer Temperatursteigerung bis auf 70° C.

Die gewonnenen Kunststoffblöcke wurden mit einer diamantierten Innenlochsäge (Fa.: Metals Research, Cambridge) geschnitten.
Aus den in Kunststoff eingebetteten Knochen-Metall-Präparaten konnten ohne Herauslösung der Metallteile und damit ohne Zerstörung der unmittelbaren Kontaktbereiche zwischen Knochen und Implantat 20-40μdicke Schnitte gewonnen werden.

3.3. Fluoreszenzmikroskope

Aufgrund der Vitalmarkierung der Knochenregenerationszonen nach der Methode der polychromen Sequenzmarkierung war eine qualitative und quantitative Aussage über den Heilungsverlauf der Knochenwunde nach Implantaten möglich.
Bei der Betrachtung der histologischen Präparate mit dem LEITZ-Forschungsmikroskop ''Orthoplan'', das mit einer Durchlicht-Fluoreszenzeinrichtung ausgestattet war (420 - 460 μm), ergaben sich, entsprechend der Farbenfolge der polychromen Sequenzmarkierung, folgende Bilder im Bereich der Havers'schen Systeme.

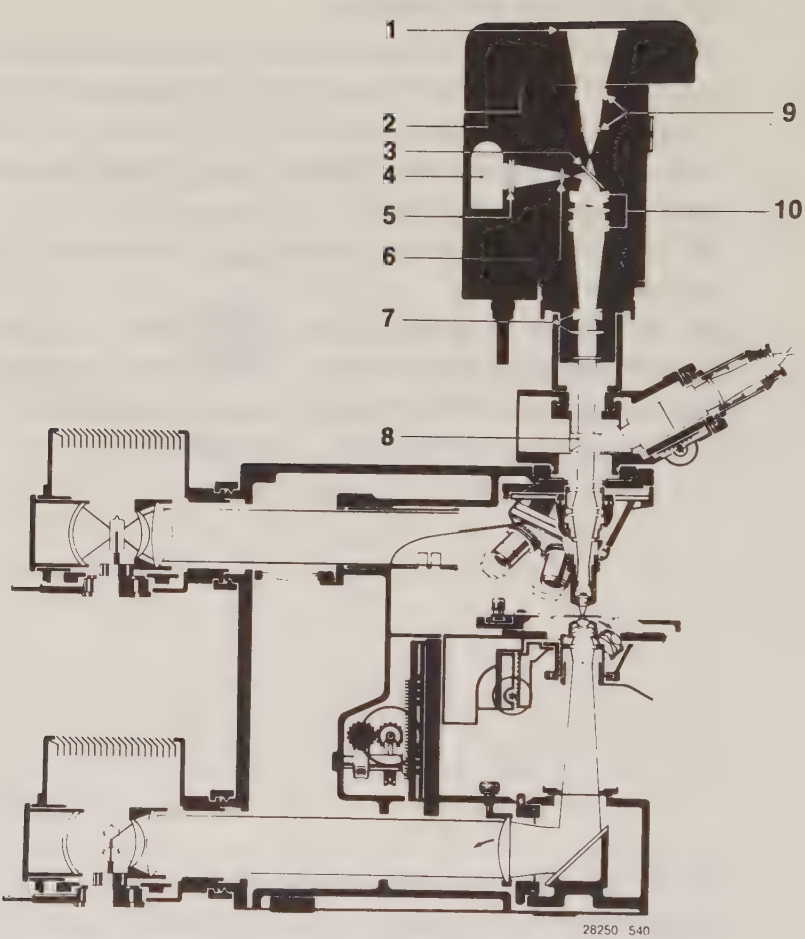
Abb. 13:

Um die Osteone lagern sich von außen nach innen Calcein blau, Xylenol orange, Cylcein grün, Achromycin = gelb, Alizarinkomplexon (= rot).
Nach fluoreszenzmikroskopischer Sichtung aller von SPIEKERMANN gewonnenen Präparaten wurden pro Beagle 2 Präparate ausgewählt und pro Mandibula 8-12 Osteone berechnet.
Für die Auswertung wurden nur jene Osteone erfaßt, die folgende Kriterien erfüllten:

1. Vollständige Markierung (5fach)
2. nahezu kreisförmiges Wachstum der Osteone.

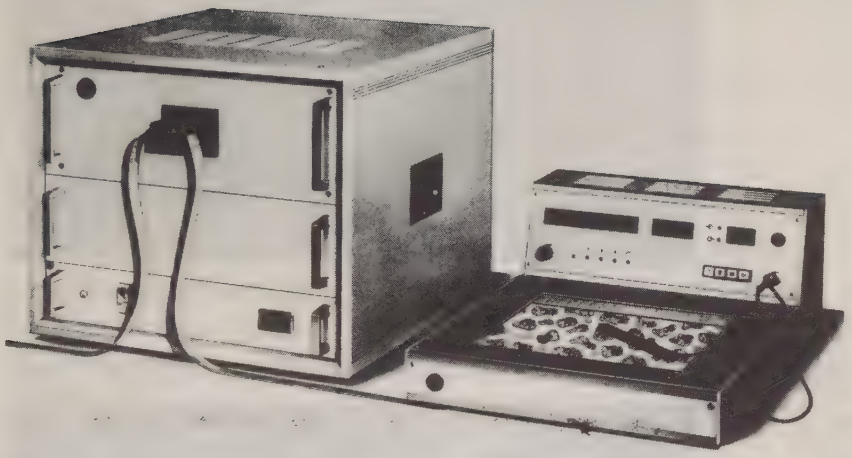
3.4. Aperative Einrichtung

Als Grundinstrument diente das Forschungsmikroskop ORTHOPLAN der Firma LEITZ, an das eine LEITZ-Durchlicht-Fluoreszenzeinrichtung adaptiert war bestehend aus einem Sperrfilterschieber (K 430) und einem Erregerfilter-Revolver für UV-Anregung.
Die Beleuchtung erfolgte über das Lampenhaus 250 der Fa. LEITZ.
Die einzelnen Osteone wurden mit einem Farbumkehrfilm (Kodak Ektachrome, 18 Din) photografiert, dazu wurde das ORTHOPLAN mit einer automatischen Aufsatzkamera ORTHOMAT - W versehen.



6 Linse
7 Pankratisches Aufnahmeokular
8 Teilerprisma
9 Kameraobjektiv
10 Pankratisches Aufnahmeokular

Abb. 14:
Fluoreszenzmikroskop ''ORTHOPLAN''
mit Aufsetzkamera ''ORTHOMAT W''



Bildanalyse System LEITZ A.S.M. (Analyse System manuell)
links: Versorgungs- und Steuereinheit mit Mikrocomputer zur Datenverarbeitung
rechts Bedien- und Zeichenpult

22/51 521 R

Abb. 15:
Bildanalyse System LEITZ A.S.M.

Die gewonnenen Dias wurden mit einem PRADOVIT AUTOFOKUS der Fa. LEITZ über einen Spiegel direkt auf die Zeichenplatte des A.S.M. projeziert.
Dem Betrachter bot sich folgendes Bild: um jedes Osteon lagen farblich abgesetzt konzentrische Kreise, die den einzelnen Fluorochromen entsprechen.

Abb. 16:
Osteone mit konzentrischen farblichen Ringen, die den applizierten Fluorochromen entsprechen.

Mit einem speziellen Zeichenstift wurden die Konturen der einzelnen Farbringe nachgezogen, wobei die jeweilige Position des Zeichenstiftes — in digitale Koordinate umgesetzt — einer Auswerteinheit zugeführt wurde, die mit einem frei programmierbaren Mikroprozessor verbunden war. Dadurch ergab sich ein ständiger Dialog zwischen Mensch und Maschine. Jeder Befehl des Benutzers an das A.S.M. wurde mittels eines akustischen Signales quitiert. Unterlief dem Operateur während der Befehlseingabe ein Fehler, den die Logik des A.S.M. als Fehler erkannte, wurde jede weitere Dateneingabe blockiert. Erst nachdem der Operateur seinen Fehler erkannt, akzeptiert und die Richtigstellung eingeleitet hatte, konnte mit der Analyse fortgefahren werden.
Durch diese eingebaute ''Logikschaltung'' wurden die Eingabefehler bei der Analyse auf ein Minimum reduziert.
Bei diesem neuen Verfahren sind die phychische Belastung und der Zeitaufwand gegenüber den bisher angesehenen Auswertungshilfen von NATTER (1975), der mikroskopische Berechnungen der Osteonendurchmesser durchführte, und gegenüber dem von STUHLER (1978) angegebenen Verfahren gering. STUHLER schlug vor: photographieren aller Osteone mit einem Diafilm, Projektion mit einem fest installierten Projektor in definiert einheitlichem Abstand auf gewichtsmäßig genormtes Papier, konturieren der Aussenränder, ausschneiden der einzelnen Banden und auswiegen mit einer Mikrowaage.

3.5. Berechnung

Als Baustein des Knochens bietet sich das Osteon für Kontrollmessungen an. Es wächst von außen nach innen. Abstrahiert kann das wachsende Osteon eine definierte max. Fläche erreichen. Diese wird durch eine Markierung zum Zeitpunkt to festgelegt (erste Markierung).

Für Berechnungen kann man folgendem Postulat ausgegangen werden: Ein heranwachsendes Osteon wird durch regelmäßig applizierte Fluorochrome in seiner Wachstumstendenz definiert. Wenn das elektromagnetische Feld auf das Knochenwachstum einen Einfluß nimmt, so muß ein stimuliertes Osteon gegenüber einer Kontrollgruppe pro Zeiteinheit einen veränderten Knochenzuwachs aufweisen.

Mathematisch ergibt sich laut STUHLER folgender Zusammenhang:

$$\frac{\text{Gewachsene Fläche}}{\text{Mögliche Gesamtfläche}} = \frac{X}{100}$$

Die theoretisch erreichbare Gesamtfläche des Osteons zum Zeitpunkt to ist als Rechengröße vorgegeben, da das Osteon wie oben gesagt von außen nach innen wächst. Es läßt sich somit ein übersichtlicher Ansatz aufstellen: Der tatsächliche Zuwachs (F_1, F_2 etc.) verhält sich zum theoretisch möglichen Gesamtzuwachs wie X : 100, X definiert den prozentualen Zuwachs pro Zeiteinheit.

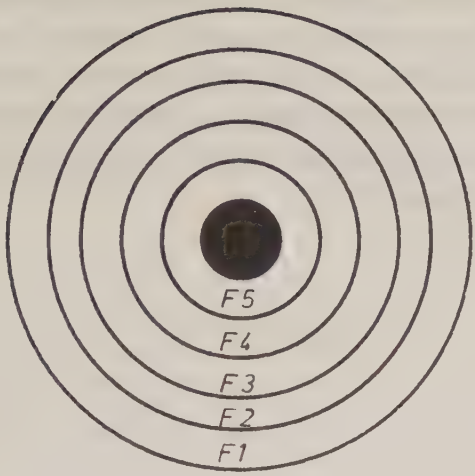


Abb. 18:
Die Flächen F_1 - F_5 entsprechen den Fluorochromen blau - rot

47

$$\frac{F_1}{F_{ges}} = \frac{X_1}{100}$$

$$X_1 = \frac{100 \cdot F_1}{F_{ges}}$$

$$X_2 = \frac{(F_1 + F_2) \cdot 100}{F_{ges}}$$

Mit dem halbautomatischen Bildanalysator wurden somit praktisch fehlerfrei durch Abfahren der Konturen auf der Zeichentafel die Flächenwerte von F_1 - F_5 gemessen. Für jedes Osteon wurde eine besondere Einzelanalyse gemacht, die der angeschlossene Drucker sofort auswarf.

```
LEITZ - A S M

NAME:
PROBE:
DATUM:
VERGROESSERUNG:          1.0000
GESAMT-TEILCHENZAHL:         12

ASM-EINZELTEILCHENANALYSE

PART. # KOMP. # PARAM. #     MESSWERT
      1         1         12       1528.
      2         1         12       891.6
      3         1         12       531.8
      4         1         12       211.5
      5         1         12       55.35
      6         2         12       1998.
      7         2         12       1370.
      8         2         12       939.4
      9         2         12       882.6
     10         2         12       404.0
     11         2         12       181.3
     12         2         12       60.42
```

Abb. 19: Analysenblatt

3.6. Ergebnisse

elektrostim. Beagle						nicht stim. Beagle					
I,	III,	IV,	V,	VI,	X	II,	VII,	VIII,	IX,	XI,	XII

Tab. 5

	7	14	21	28	35	Tage
I	31	58	74	85	94	
III	34	62	76	85	92	
IV	34	58	75	84	92	
V	38	60	77	85	94	
VI	36	60	77	85	94	
X	36	59	75	83	93	

Tab. 6

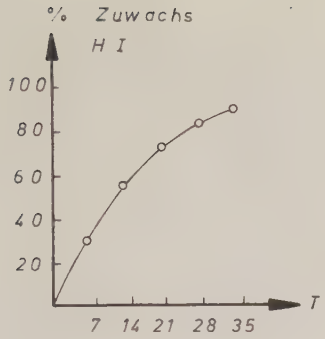
Prozentualer Zuwachs bei den stimulierten Tieren. Mittelwerte gebildet aus 8 - 12 Einzeltieren.

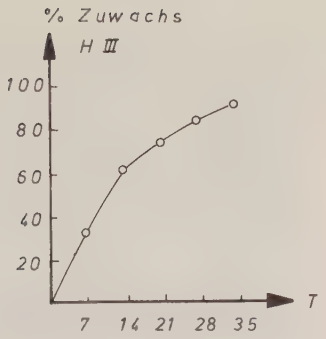
	7	14	21	28	35 Tage
II	32	52	68	78	86
VII	35	56	70	80	91
VIII	33	51	67	77	88
IX	32	52	70	80	89
XI	30	54	72	81	90
XII	31	53	71	79	91

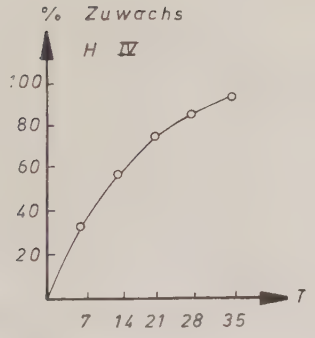
Tab. 7

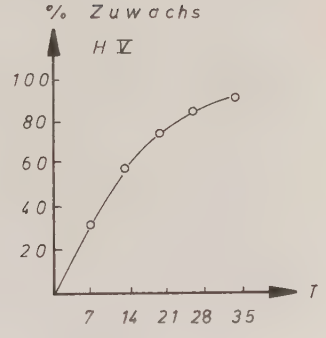
Kontrollgruppe (nicht stimulierte Beagle)

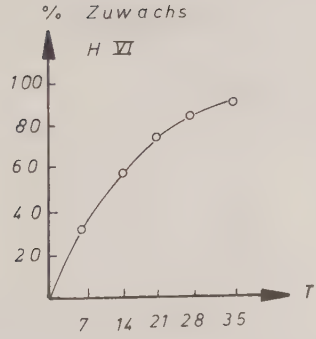
Die Ergebnisse der stimulierten Osteone (Verfahren KRAUS-LECHNER) übertreffen die Kontrollgruppe, da der prozentuale Knochenzuwachs nach 7, 17, 21, 28 und 35 Tagen jeweils größer war als bei den nicht stimulierten Kontrolltieren.

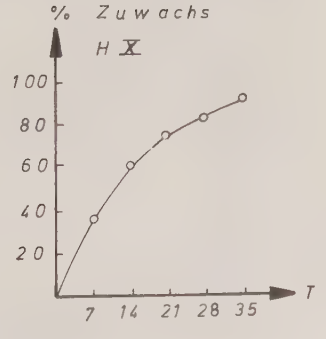




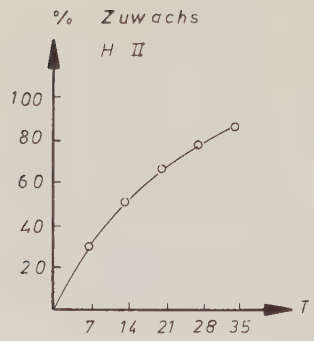


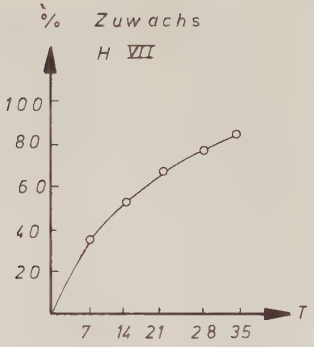


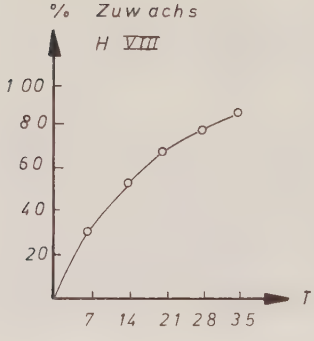


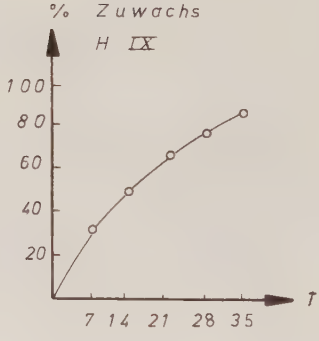


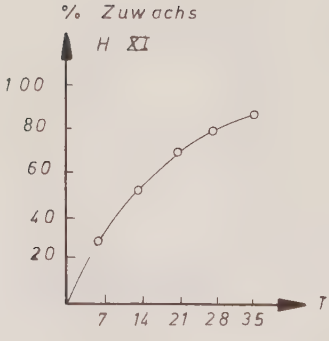
Prozentualer Knochenzuwachs bei den stimulierten Osteonen

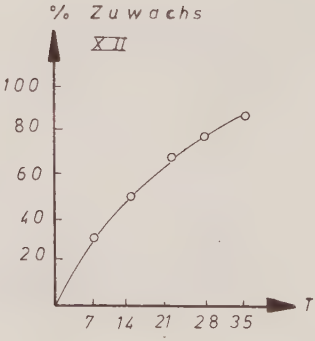












Prozentualer Knochenzuwachs bei den nicht stimulierten Osteonen

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird nach Einführung in die physikalisch-chemischen Grundlagen der Fluoreszenz, der Fluoreszenzmikroskopie und der polychromen Sequenzmarkierung eine neue Auswertungshilfe zur Osteonenausmessung von polychrom sequenzmarkierten Knochenpräparaten vorgestellt.

Zur Auswertung gelangten im Tierexperiment (Beagle) gewonnene sequenzmarkierte Knochenpräparate die 1978 von SPIEKERMANN im Rahmen eines Forschungsvorhabens in der Dentalimplantologie gewonnen worden waren.

Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurde von uns erstmals der halbautomatische Bildanalysator A.S.M. der Firma LEITZ verwendet.

Bisher waren bei der Ausawertung sequenzmarkierter Knochenpräparate im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie die von NATTER (1975) und von STUHLER (1977) angegebenen Verfahren u.a. gebräuchlich.

NATTER gab an, das Wachstum und damit die Größenzunahme der Osteone mit Hilfe mikroskopischer Berechnungen zu ermitteln.

STUHLER entwickelte ein Verfahren, bei dem die zu messenden Präparate (Osteone) zunächst mit einem Farbumkehrfilm photographiert wurden. Die so gewonnenen Dias wurden dann mit einem Projektor in definiertem Abstand auf gewichtsmäßig genormtes Papier (70 g/m^2) projeziert. Auf den so gewonnenen Bildern wurden die Außenringe der Osteone konturiert und anschließend die einzelnen Farbbanden ausgeschnitten. Über das Gewicht der Farbbanden konnte dann pro Osteon der prozentuale Knochenzuwachs berechnet werden.

Bei dem von uns neu entwickelten Verfahren wurden die Berechnungen mit Hilfe des LEITZ A.S.M. durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen halbautomatischen Bildanalysator mit dem bestimmte Kenngrößen eines Bildes objektiv beschrieben werden können.

Die zu messenden Präparate wurden ebenfalls — wie bei NATTER und STUHLER — mit einem Farbumkehrfilm photographiert. Die Dias wurden mit einem Projektor über einen Spiegel auf das Zeichenpult des A.S.M. projeziert. Die Konturen der einzelnen Farbringe wurden von jedem zu messenden Osteon mit einem speziellen Zeichenstift nachgezogen, dabei wurde die jeweilige Position des Zeichenstiftes in digitale Koordinatenwerte umgesetzt und einer Auswerteinheit zugeführt.

Über den angeschlossenen Drucker konnten die einzelnen Flächenwerte des jeweiligen Osteones direkt ausgeworfen werden. Man erhielt somit für jedes Osteon eine Einzelanalyse und war damit in der Lage, das Osteon in seinem prozentualen Flächenzuwachs zu berechnen.

Nach unseren ersten Erfahrungen scheint unsere neue Auswertungshilfe zur Osteonenausmessung bei polychrom sequenzmarkierten unentkalkten Knochenpräparaten gegenüber den von NATTER und STUHLER angegebenen Verfahren verbessert, weil:

a) sich der messtechnische Aufwand in Grenzen hält;
b) die Fehlermöglichkeiten praktisch gleich null sind;
c) der Zeitaufwand — auch von Berechnungen größeren Umfanges — gering ist;
d) sich der halbautomatische Bildanalysator LEITZ A.S.M. durch leichte Bedienbarkeit auszeichnet.

Unser neues Verfahren stellt somit eine Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Osteonenausmessung bei polychrom sequenzmarkierten unentkalkten Knochenpräparaten dar und kann nach unseren Erfahrungen empfohlen werden.

Die von SPIEKERMANN (1978) mit Hilfe eines Meßmikroskopes gewonnenen Ergebnisse (die Osteogenese im periimplantären Raum läuft bei einer Elektrostimulation — Verfahren KRAUS-LECHNER — schneller ab, was in den ersten 6 Wochen post.op. zu signifikant schmaleren Bindegewebsbreiten zwischen Tantal/ Titanimplantaten und dem periimplantären Knochen führt) konnten mit der neuen Auswertungshilfe bestätigt und quantitativ untermauert werden.

5. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird versucht, die chemisch-physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz, der Fluoreszenzmikroskopie und der polychromen Sequenzmarkierung darzustellen.
Im zweiten Teil wird eine neue Auswertungshilfe zur Osteonenausmessung von polychromsequenzmarkierten unentkalkten Knochenpräparaten vorgestellt.
Das neue Verfahren wurde erprobt durch die Auswertung von Knochenpräparaten, die 1978 von SPIEKERMANN im Rahmen eines Forschungsvorhabens in der Dentalimplantologie gewonnen worden waren.
Das von SPIEKERMANN ermittelte Ergebniß, daß bei elektro-magnetischer Stimulation (Verfahren KRAUS-LECHNER) die Osteogenese post.op. im periimplantären Raum von enossalen Implantaten beschleunigt verläuft, konnte bestätigt und quantitativ untermauert werden.

Das neue Auswertungsverfahren ist den bisher gebräuchlichen Verfahren (NATTER 1974 und STUHLER 1977) überlegen und kann empfohlen werden.

6. Danksagung

Es ist mir ein besonderes Anliegen an dieser Stelle Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. SPIEKERMANN für die freundliche Betreuung und die immerwährende Unterstützung bei dieser Arbeit zu danken.

Herrn Dr. E. BENTZ, Firma LEITZ — Wetzlar danke ich für die Überlassung des Bildanalysators LEITZ A.S.M.

7. Lebenslauf

Am 28. November 1949 wurde ich als zweiter Sohn des Bankkaufmannes Werner Gehlhar und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Rakow, in Kiel geboren.
Nach 4 Grundschuljahren wurde ich zur ENKING-Realschule in Kiel umgeschult und erwarb dort 1966 die Mittlere Reife.
Anschließend absolvierte ich die EINJÄHRIGE-HÖHERE-HANDELSSCHULE in Hannover.
Von 1967 bis 1970 machte ich eine Lehre als Starkstromelektriker, studierte Elektronik und absolvierte abends die Berufsaufbauschule.
1970 bis 1973 besuchte ich das Abendgymnasium in Hannover, arbeitete gleichzeitig als Industrieelektroniker im VW-Werk und belegte als Gasthörer an der Universität Hannover Physik. 1973 bestand ich das Abitur.
Im WS 1973 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde in Düsseldorf, wo ich 1976 die zahnärztliche Vorprüfung und 1978 das Staatsexamen bestand.
Von November 1978 bis November 1979 war ich Assistent in der Zahnärztlichen Chirurgie der Westdeutschen Kieferklinik der Universität Düsseldorf.
Seit dieser Zeit bin ich als Stabsarzt bei der Bundeswehr als Leiter der Heereszahnstation 213 in Lingen/Ems tätig.

Peter Gehlhar
Düsseldorf, Januar 1980

8. Literaturverzeichnis

ADKINS, K.F.:
Alizarin Red as an intravital fluorochrom
in mineralizing tissue
Stain. Techn. **40,** 69-70 (1965)

BOOTHE, J.H.:
Chimestry of tetracycline
Antibiotics Anual (1953)

EGER, W., GÖTZ, J. and H. KÄMMERER:
Herstellung von Dünnschliffen aus Knochen
und Weichgewebe nach Markierung mit Tetracyclinen
Langenbecks Arch.Klin.Chir. **306,** 205-214 (1964)

FROST, H.M.:
Tetracycline bone labeling
J. New Drugs **1,** 206-216 (1951)

FROST, H.M.:
Histological Analysis of bone remodeling
Calc.Tiss.Res. **3,** 211-237 (1969)

HARMS, H.:
Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie
Staufenverlag, Kamp-Lintfort (1965)

HARRIS, W.H.:
A microscopic method of determinating bone growth
Nature **188,** 1038 (1960)

HAITINGER, M.:
Fluoreszenzmikroskopie — ihre Anwendung in der Histologie und der Chemie
Hain-Verlag, Wien (1937)

HOLLE, M.:
Vitalitätsuntersuchungen an Knochenmarkszellen mittels Fluoreszenzmikroskopie
Folia.Haematol. Leipzig, **105,** 66-76 (1978)

MÜLLER, W. und H. WASMUND:
Das LEITZ-A.S.M. — ein System zur halbautomatischen Bildanalyse
Leitz-Mitt. Wiss.u.Techn.
Bd. VI, Nr. 8 316-317 (1976)

MILCH, R., RALL, D., and J. TOBI:
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone
J. Bone and joint surg. **40,** 897 (1958)

NATTER, E.:
Der Einfluß von Parathormon auf das Knochen- und Zahnwachstum
Med.Diss., Göttingen (1975)

OLERUD, S. and G.L. LORENZI:
Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorbtion
J. Bone and joint surg. **52,** 274 (1970)

RAHN, B.A. and S.M. PERREN:
Alizarinkomplexon-Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau
Experimenta **28,** 180 (1971)

RAHN, B.A. and S.M. PERREN:
Calcein blue as a fluorescent label in bone
Experimenta **26,** 519 (1970)

RAHN, B.A. and S.M. PERREN:
Xylenol orange — a fluorochrome usefull in polychrome sequential labeling of calcifying tissue
Stain.Tech. **46,** 125 (1970)

RAHN, B.A., FLEISCH, H., MOHR, R. and S.M. PERREN:
The effect of fluorescent labels on bone growth and calcification in tissue culture
Europ.Surg.Res. **2,** 137 (1970)

RITTMANN, W. and S.M. PERREN:
Corticale Knochenheilung nach Osteosynthese und Infektion
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1974)

SCHARGUS, G. und K.F. KOCH:
Polychrome Sequenzmarkierung der Knochenheilung mit verschiedenen Fluorochromen
Leitz.Mitt.Wiss.u.Tech.
Bd. VI, Nr. 5, 201-205 (1975)

STUHLER, TH., KAISER, G., MEFFERT, O. und D. STRACHE:
Der Einfluß des niederfrequenten Wechselstrom-Systemes Kraus-Lechner auf das Knochenwachstum
Arch.Orthop.Traumat.Surg. **91,** 297-305 (1978)

SPIEKERMANN, H.:
Enossale Implantate i.d. prothetischen Zahnheilkunde
Klinische Erfahrungen und tierexperimentelle Untersuchungen
Habilitationsschrift, Düsseldorf (1978)

STRUGGER, S.:
Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridin-Orange-Färbung
Deutsche Tierärztl. Wsch. **49,** 525 (1941)

SZUKI, H.K. and A. MATHEWS:
Two-calour fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis (N.N.-di-(carbomethyl) aminomethyl) fluorescein
Stain.Tech. **41,** 47 (1966)